

Aspergillus* DNA'sının Klinik Örneklerde Gösterilmesine Yönelik Geliştirilen Kalitatif Gerçek Zamanlı PCR Yönteminin Kalite Kontrolü

Quality Control of the Qualitative Real Time PCR Method for the Detection of *Aspergillus* DNA in Clinical Samples

Sevgi ÖZYEGEN ARSLAN¹, Merve AYDIN², Israa Ibrahim Khalil JABBAN², Ayşe SEYER², Ali Adil FOUAD², Burçe YALÇIN³, Feyza DEMİR², Gülşah BİTER², Ayşe KALKANCI², Semra KUŞTİMUR²

¹ Bolu İzzet Baysal Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Bolu, Türkiye

² Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

³ İstanbul Bakırköy Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

* Bu çalışmanın bir bölümü 6. Ulusal Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi (15-19 Haziran 2010, Ankara)'nde poster olarak sunulmuştur.

ÖZET

Giriş: *Aspergillus* cinsi küf mantarlarının klinik örneklerde kültürde üretilme başarısı %50'yi geçmemektedir. Nötropenik ateş dönemindeki hastaların bir çoğunda ampirik antifungal tedavi başlanması nedeniyle, kültürde herhangi bir mantarın üretilme olasılığı azalmaktadır. Moleküler yöntemlerde hedeflenen mikroorganizmanın DNA'sı gösterildiği için tedavi başlanmış olması tanıyı olumsuz yönde etkilememektedir. Bu çalışmada, *Aspergillus* cinsi mantarların DNA'sının gösterilmesi için geliştirilen kalitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi sunulmuştur.

Materyal ve Metod: Örneklerden DNA izolasyonu hazır sistem kullanılmadan yapılmıştır. *Aspergillus* cinsi mantarların rDNA gen bölgesinden 28S alt ünitesi hedeflenmiş, TaqMan amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Yöntemin aspergillozdaki tanısal değeri farklı örnekler kullanılarak incelenmiştir. *Aspergillus* kolonisi ile kontamine edilen "simüle" kan örnekleri, aspergilloz oluşturulan deney hayvanı kan ve dokuları ve aspergilloz şüphesiyle takip edilen hasta örnekleri ile toplam 60 örnek çalışılmıştır.

Bulgular: En çok yalancı negatiflik deneysel olarak aspergilloz oluşturulmuş hayvanların doku örneklerinde elde edilmiştir. Hayvan doku örneklerinin 4 (%40)'ünde, hayvan kan örneklerinin 3 (%30)'ünde, simüle kan örneklerinin 2 (%20)'sinde, hasta örneklerinin 1 (%10)'inde yalancı negatif sonuç alınmıştır. Koloni süspansiyonlarının tamamı pozitif bulunmuştur.

Sonuç: Geliştirdiğimiz yöntemin kan örneklerinde *Aspergillus* DNA'sının gösterilmesinde başarılı olduğu ancak, doku örnekleri için geliştirilmesi gerektiğine karar verilmiştir. Yöntemin tanısal değerinin geniş gruplarda yapılacak çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Aspergilloz; Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu; Kan; Doku; Kalite kontrolü

SUMMARY

Quality Control of the Qualitative Real Time PCR Method for the Detection of *Aspergillus* DNA in Clinical Samples

Sevgi ÖZYEĞEN ARSLAN¹, Merve AYDIN², Israa Ibrahim Khalil JABBAN², Ayşe SEYER², Ali Adil FOUAD²,
Burçe YALÇIN³, Feyza DEMİR², Gülşah BİTER², Ayşe KALKANCI², Semra KUŞTİMUR²

¹ Clinic of Medical Microbiology, Bolu İzzet Baysal Obstetrics and Pediatrics Hospital, Bolu, Turkey

² Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, University of Gazi, Ankara, Turkey

³ Clinic of Medical Microbiology, Istanbul Bakirkoy Obstetrics and Pediatrics Training and Research Hospital, Istanbul, Turkey

Introduction: The culture of clinical samples is positive in only 50% of the aspergillosis cases. In most neutropenic fever patients, anti-fungal treatment is generally commenced based on empirical considerations and reduces the growth rates in microbiological cultures. Polymerase chain reaction (PCR) screening for circulating DNA is not related to treatment in order for the DNA to be detected under antifungal effect. We evaluated the utility of qualitative real time PCR assay for the detection of *Aspergillus* DNA.

Materials and Methods: DNA isolation was performed without a commercial system. The presence of DNA from the samples was detected using TaqMan PCR targeting fungal 28S rDNA gene. Diagnostic approach of the assay was evaluated by using different samples. Sixty samples including blood samples contaminated with *Aspergillus conidia*, colony suspensions, tissue and blood samples of experimentally infected animals, and patient samples obtained from suspected cases were subjected to testing.

Results: False negative results were obtained from tissue samples of experimentally infected animals. When the results were analysed, 4 (40%) of the tissue samples, 3 (30%) of the blood samples, 2 (20%) of the simulated blood samples, and 1 (10%) of the patient samples failed to achieve the same level of detection. Colony suspensions were found to be all positive (100%).

Conclusion: The efficiency of the *Aspergillus* PCR is limited in tissue samples, but sufficient in blood samples, and should be qualified to exclude false negativity. Clinical studies with large number of samples should be initiated to integrate PCR in the diagnostic armamentarium of aspergillosis.

Key Words: Aspergillosis; Real time polymerase chain reaction; Blood; Tissue; Quality control

GİRİŞ

Aspergilloz tüm dünyada en yaygın görülen invaziv küf enfeksiyonudur. Fırsatçı *Aspergillus* enfeksiyonları bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda hayatı tehdit eden enfeksiyonlara yol açmaktadır. Aspergillozun tanısı için klinik örneğin doğrudan mikroskopta incelenmesinde küf elemanlarının gösterilmesi ve kültürde mantarın üretilmesi gereklidir. Ancak, kültür ile küf mantarlarının üretilmeleri en çok %50 olguda mümkün olmaktadır. Bu nedenle erken tanı için geliştirilen testler özellikle kritik hastalarda tedavinin yönlendirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır^[1]. İnvaziv mantar enfeksiyonlarının moleküler tanısı bu açıdan ümit

verici bir gelişmedir. Fungal DNA'nın hastanın kanında saptanması, konvansiyonel yöntemlere göre çok erken olmaktadır. Bu amaçla en sık polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılmaktadır^[2]. Konvansiyonel PCR yanında son yıllarda geliştirilen gerçek zamanlı sistemler kontaminasyon riskini en aza indirmeleri ve hızlı olmaları nedeniyle rutin uygulamada tercih edilmektedir. Gerçek zamanlı kantitatif moleküler yöntemler hem tanı hem de tedavi yanıtını izlemede önemlidir^[3,4].

İnvaziv mantar enfeksiyonlarının tanı kriterlerini belirleyen çalışma grubu "European Organization for Research and Treatment of Cancer-Mycology Study Group (EORTC-MSG)" tarafından asper-

gilloz klinik tanısı olası, yüksek olası ve kanıtlanmış olarak üç şekilde sınıflandırılmıştır^[5]. Bu sınıflandırmanın yapılmasında galaktomannan anti-jen pozitifliği rol oynamaktadır. Ancak moleküler yöntemler henüz standardize edilmemiş oldukları için EORTC-MSG tanı kriterleri içine henüz alınmamıştır^[6]. Ancak Avrupa'da çalışmalarına devam eden "European *Aspergillus* PCR Initiative (EAPC-RI)" çalışma grubu ve "International Society for Human and Animal Mycoses (ISHAM)" tarafından *Aspergillus* PCR yönteminin standardize edilmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir^[7]. Klinik örneğin serum veya kan olması, örneğin miktarı, DNA eldesinde kullanılacak enzimin türü, hazır kit veya otomatik sistem kullanılması, çoğaltılacak bölgeye karar verilmesi gibi bütün teknik ayrıntılar değerlendirilmektedir^[8-10].

Bu çalışmada, *Aspergillus* cinsi mantarlara ait DNA'nın klinik örneklerde gösterilmesi için ana-bilim dalımızda geliştirdiğimiz kalitatif gerçek zamanlı PCR yönteminin kalite kontrol basamakları sunulmaktadır. Yöntemin güvenilirliği farklı klinik örnekler kullanılarak test edilmiş ancak gerçek hasta örnekleri sınırlı tutulmuştur. Çalışmanın amacı geliştirdiğimiz yöntem ile aspergilloz tanısı koyabildiğimiz hasta sayısının belirlenmesi değildir. Bu nedenle, *Aspergillus* koloni süspansiyonları kullanılarak, simüle aspergilloz kan örnekleri hazırlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Örnekler

Aspergillus DNA'sının gösterilmesi için koloni süspansiyonları, aspergilloz oluşturulan deney hayvanlarının kan ve doku örnekleri, *Aspergillus* süspansiyonu ile kontamine edilen simüle kan örnekleri ve galaktomannan antijeni pozitif bulunan ve klinik olarak aspergilloz tanısı alan hastaların kan örnekleri kullanıldı. Ayrıca testin yalancı negatifliğinin araştırılması amacıyla, galaktomannan antijeni negatif bulunan ve klinik olarak aspergilloz şüphesi olmayan hasta kanı örnekleri kullanıldı. Koloni süspansiyonları (10 adet), aspergillozlu deney hayvanlarının kanı (10 adet) ve doku örnekleri (10 adet), simüle kan örneği (10 adet), aspergillozlu hasta kanı örnekleri (10 adet), aspergilloz olmayan hasta kanı örnekleri (10 adet) olmak üzere toplam 60 adet örnek çalışıldı.

Aspergilloz Modeli

Deney hayvanı olarak, her biri 2.7-3 kg ağırlığında, erkek, Yeni Zelanda ırkı tavşanlar kullanıldı. Kullanılan bütün hayvan deneyleri Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul onayı ile yapıldı (GÜET-09.032). Aspergilloz oluşturmak üzere tavşanların kulak veninde içinde *Aspergillus fumigatus* 10⁸ konidya/mL bulunan süspansiyondan 1 µL verildi^[11]. Aspergilloz oluşturulmasını takip eden 72 saat sonunda deneklerden önce kan örnekleri, ötenazi sonrası dalak, böbrek ve karaciğer örnekleri alındı. Bütün doku örnekleri sıvı azot ile donduruldu ve -20°C'de saklandı. Kan örnekleri ön dondurma yapılmadan -20°C'de saklandı. Aspergillozun varlığı deney hayvanlarının kan ve doku örneklerinde *A. fumigatus* kolonisi üretilmesiyle doğrulandı. Galaktomannan antijeni pozitif olan ve olmayan hasta örneklerinin hiçbirinde kültürde *Aspergillus* kolonisi elde edilmedi.

Galaktomannan Antijen Testi

Platelia® *Aspergillus* ELISA kiti (BioRad, Fransa) üretici firma önerilerine göre kullanıldı. 300 µL serum örneği kullanıldı. Sonuçlar 450 nm dalga boyunda optik okuyucuda okundu (Elx800, BioTek, ABD). Kontrol serumları kullanılarak her serum için indeks değeri hesaplandı: İndeks ≥ 0.7 ve üzerinde olan örnekler pozitif olarak değerlendirildi. Serumlarında galaktomannan antijeni pozitif veya negatif bulunan hastaların tam kan örneklerinde PCR çalışması yapıldı.

DNA Eldesi

Kan ve doku örneklerindeki eritrositlerin uzaklaştırılması için bir eritrosit parçalama tamponu (EPT) (TRIS 10 mM, Magnesium Chloride 5 mM, Sodium Chloride 10 mM) kullanıldı. Koloni süspansiyonlarına EPT basamağı olmadan DNA eldesi yapıldı^[12,13]. Eritrositlerin parçalanıp uzaklaştırılması için firmalardan satın alınabilecek hazır karışımlar da bulunmaktadır. DNA izolasyonu için 100 mg/mL proteinaz K içeren parçalama tamponu (TRIS 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 50 mM, SDS %2) 100 µL eklendi ve 65°C'de iki saat bekletilme yöntemi kullanıldı. Elde edilen DNA'nın saflaştırılması için ise fenol-kloroform-izomil alkol (FKİ) yöntemi kullanıldı. DNA çökeleği kuruduktan sonra üzerine 30 µL Tris ve EDTA (TE) ile hazırlanan örnek çözme tamponu eklendi. DNA +4°C'de bir hafta, -20°C'de veya -80°C'de altı ay saklandı.

Aspergillus DNA'sının Çoğaltılması

Elde edilen DNA'nın çoğaltılması için rDNA'nın 28S alt ünitesinden seçilen gen bölgelerini çoğaltan beş farklı primer ve prob karışımı ile 60 örnekte *Aspergillus* DNA'sı kalitatif olarak araştırıldı. Primer ve prob kombinasyonlarından CTG TCC GAG CGT CAT TG, TCC TCC GCT TAT TGA TAT primerleri ve FAM ve TAMRA ile işaretli olan AGC CAG CAC CCA ACT TTA TTT TaqMan probe en iyi sonuçların alındığı seçenek olarak kayıt edildi. Amplifikasyon LightCycler 2.0 (Roche, ABD) cihazında gerçekleştirildi^[14]. Amplifikasyon döngüsü 95°C'de 10 sn denatürasyon ile başladı, 10 sn 95°C'de ve 40 sn 60°C'den oluşan 50 tekrar yapıldı. Analizler "absolute quantification" ile yapıldı. DNA varlığı reaksiyona girilen mutlak "Crossing point = Cp" değerleri ile doğrulandı.

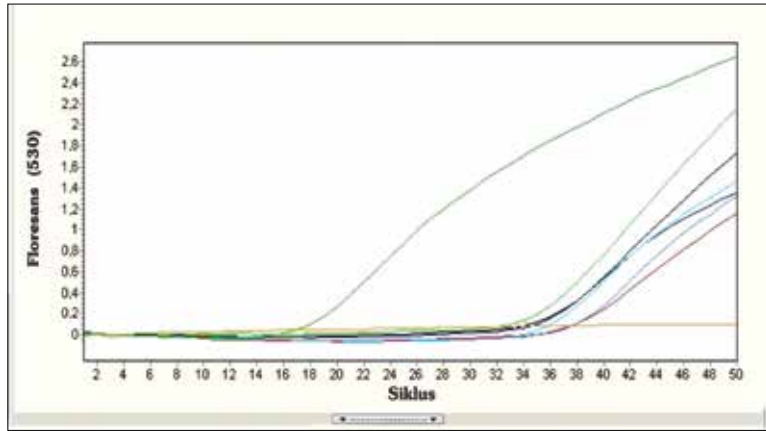
BULGULAR

Çalışmada izlenen kalite kontrol basamakları bir şekil oluşturularak özetlenmiştir (Şekil 1). Örneklerde DNA varlığı spektrofotometrik olarak doğrulandıktan sonra amplifikasyon işlemine başlanmıştır. *Aspergillus* DNA'sının klinik örneklerde gösterilmesi için en özgül ve en duyarlı primer-prob kombinasyonunun, rDNA gen bölgesi 28S alt ünitesinden seçilen primer ve prob olduğu görülmüştür. Bu kombinasyon ile yapılan deneylerde en düşük yalancı negatif sonuçlar alınmıştır. Örnek olması açısından bir sonuç ekranı Şekil 2'de gösterilmiştir. Test başı maliyeti 12 TL olarak hesaplanmıştır. Örnekten DNA eldesi için



Şekil 1. *Aspergillus* DNA'sı aramaya yönelik gerçek zamanlı PCR yönteminin kalite kontrol basamakları.

gerekli süre 3.5 saat, çoğaltılması için gerekli süre ise hazırlama dahil 1 saat olarak hesaplanmıştır. Toplam 60 örneğin %16 (10 örnek)'sında *Aspergillus* DNA'sı var olmasına rağmen, çoğaltılamamıştır. En çok yalancı negatiflik deneysel olarak aspergilloz oluşturulmuş hayvanların doku örneklerinde elde edilmiştir. Aspergillozlu deney hayvanı doku örneklerinin 4 (%40)'ünde, aspergillozlu deney hayvanı kan örneklerinin 3 (%30)'ünde, simüle kan örneklerinin 2 (%20)'sinde, galaktomannan antijeni pozitif hasta örneklerinin 1 (%10)'ünde yalancı negatif sonuç alınmıştır. Yalancı negatif sonuç alınan örneklerde DNA miktarları düşük bulunmuştur. Galaktomannan antijeni negatif bu-



Şekil 2. *Aspergillus* gerçek zamanlı PCR amplifikasyon eğrileri.

lunan hasta örneklerinin hiç birinde yanlış pozitif sonuç alınmamıştır. Koloni süspansiyonlarının tamamı pozitif bulunmuştur. Klinik ön tanısı aspergilloz olan hasta grubu için, galaktomannan testi esas alındığında, PCR yönteminin özgüllüğü %100, duyarlılığı deneysel modeldeki doku örneklerinde %60, kan örneklerinde %70, simüle kan örneklerinde %80, aspergillozlu hastaların kan örneklerinde %90, koloni örneklerinde %100 olarak hesaplanmıştır. Bütün sonuçlar Tablo 1'de sunulmuştur.

TARTIŞMA

Aspergilloz, immün sistemi baskılanmış ve nötropenik hastalarda ölümcül klinik tablolara yol açan invaziv bir enfeksiyondur. Akciğer başta olmak üzere kan dolaşımı enfeksiyonu da oluşturabilir. Bu enfeksiyonun tanısında kültür yöntemlerinin yetersiz kalması nedeniyle olguların büyük kısmında klinik ön tanıya radyolojik bulgular eşlik edebilmektedir^[15]. Bu grup hastayı takip eden merkezlerin EORTC-MSG tanı kriterlerine göre kanıtlanmış invaziv aspergilloz olgu sayıları kısıtlıdır. Bu nedenlerle moleküler ve serolojik yöntemlerin yaygın olarak kullanılması gündemdedir^[16]. Galaktomannan antijeni aspergilloz için özgül bir tanı testi olarak "Food and Drug Administration (FDA)" tarafından onaylanmış olan standart bir ELISA yöntemidir. PCR başta olmak üzere denemekte olan bütün moleküler yöntemler ise henüz standardizasyon aşamasında değerlendirilmektedir.

"European Aspergillus PCR Initiative (EAPCRI)" tarafından çok merkezli olarak yürütülmekte olan standardizasyon çalışmalarında bir aşama daha alınmış ve sonuçlar yayımlanmıştır^[4,7]. Bu çalışma sonuçlarına göre Aspergillus DNA'sı aranması için uygulanacak DNA eldesi basamağı belirlenmiştir. DNA çoğaltılmasında kullanılacak yöntem ile primer ve prob karışımları üzerindeki çalışmalar devam etmektedir.

Bizim çalışmamızda, EAPCRI tarafından önerilen DNA eldesi basamağına çok benzer bir protokol takip edilmiştir. Klinik örneklerden önce eritrositler uzaklaştırılmış, ardından bir parçalama tamponu ve ısı yardımıyla DNA eldesi yapılmıştır. Elde edilen DNA bizim çalışmamızda FKI yöntemi ile saflaştırılmış, EAPCRI çalışmasında boncuklara yapıştırılarak ayrılmıştır. EAPCRI çalışmasında DNA'nın boncuklara yapıştırılması için otomatize sistemler kullanılmıştır.

Bizim çalışmamızda, elde edilen DNA beş farklı primer-prob çifti ile çalışılmış ve en uygun bulunan kombinasyonla elde edilen sonuçlar burada sunulmuştur. Çalışmamızda, duyarlılığı artırmak amacıyla TaqMan sistemi tercih edilmiştir. Sonuçlarımız kalitatif olarak değerlendirilmiştir. Ancak, çalışmamızın bir sonraki basamağında kantitatif sonuç alınmasına yönelik bir standardizasyon planlanmaktadır.

Gerçek zamanlı PCR sistemleri moleküler tanı olanaklarını geliştirmiştir. Hızlı sonuç alınması, ge-

Tablo 1. Gerçek zamanlı PCR yöntemi ile alınan sonuçlar

Örnek grubu (sayı)	Kültür		PCR		PCR testinin duyarlılığı*
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	
Koloni süspansiyonu (n= 10)	Pozitif 10	Negatif -	Pozitif 10	Negatif -	%100
Simüle hasta kan örnekleri (n= 10)	Pozitif 10	Negatif -	Pozitif 8	Negatif 2	%80
Aspergillozlu hayvandan doku örnekleri (n= 10)	Pozitif 10	Negatif -	Pozitif 6	Negatif 4	%60
Kan (n= 10)	Pozitif 10	Negatif -	Pozitif 7	Negatif 3	%70
Galaktomannan pozitif hasta kan örnekleri (n= 10)	Pozitif -	Negatif 10	Pozitif 9	Negatif 1	%90

* Duyarlılık hesabında galaktomannan testi esas alınmıştır. PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu.

rektiğinde DNA eldesi basamağı dahil otomatize edilebilmeleri nedeniyle rutin tanıda avantajlıdır^[17]. Bu avantajlarına karşılık standardizasyon sorunları devam etmektedir. Özellikle kantitatif sonuç veren standart bir *Aspergillus* PCR testi henüz geliştirilememiştir. Bu çalışmada kalitatif bir sistemin kalite kontrol basamakları sunulmuştur. Kantitatif sonuç alınması için daha ayrıntılı standardizasyon basamaklarına ihtiyaç bulunmaktadır^[18,19].

Kalitatif PCR yöntemimizde deneysel olarak aspergilloz oluşturulan ve aspergilloz varlığı kültür ile doğrulanan deney hayvanlarından bazılarında ait doku ve kan örneklerinde DNA bulunmasına rağmen PCR ile çoğaltılmaları mümkün olamamıştır. Doku örnekleri için %40'a, kan örnekleri için %30'a varan bu yalancı negatifliğin, DNA çoğaltılması basamağından kaynaklanmış olması mümkündür. Çoğaltılma öncesi DNA miktarları ölçüldüğü için örneklerdeki DNA miktarları bilinmektedir. PCR negatif bulunan bu örneklerin DNA miktarları çok düşük bulunmuştur. Bu nedenle DNA eldesi basamağında bir kayıp olduğu da düşünülebilir. Ülkemizden bildirilen ve immün yetmezliği olan 120 hastadan alınan kan örneklerinde *Aspergillus* DNA'sının araştırıldığı bir çalışmada iki farklı DNA eldesi yöntemi karşılaştırılmış, 20 hastada pozitif sonuç alınmış ancak alınan bu pozitif sonuçların gerçekten aspergillozu doğrulayıp doğrulamadığı belirtilmemiştir^[20]. Sözü geçen aynı çalışmada pozitif kontrol olarak hazırlanmış örnekler kullanılmadığı için yanlış pozitiflik veya negatiflik olasılığı değerlendirilememiştir. *Aspergillus* PCR testi gıda alımından bile etkilenmektedir. Kemik iliği nakli yapılmış bir olguda hem galaktomannan antijeni hem de *Aspergillus* DNA'sı yanlış pozitif sonuç vermiştir^[21]. Bu nedenlerle *Aspergillus* PCR testinin rutin kullanılmaya başlanmasından önce ayrıntılı bir kalite kontrol işlemi uygulanmalıdır.

Bizim çalışmamızda yalancı pozitif sonuç alınmamıştır. *Aspergillus* bir küf mantarı olduğu için laboratuvar havasında bulunması ve PCR çalışması sırasında örneklerle bulaşması mümkündür. Bizim çalışmamızda olduğu gibi her basamağı dikkatlice sürdürüldüğünde, DNA eldesi basamağı negatif basınçlı güvenlik kabini içinde çalışıldığında, çoğaltma aşamasında gerçek zamanlı bir cihaz kullanıldığında yalancı pozitiflik görülmemiştir. Bu

sonuç da testin hasta tanısında kullanılabilirliğini güçlendirmektedir.

Geliştirdiğimiz yöntemde, aspergillozlu hasta örneklerinden birinde yanlış negatif sonuç alınmıştır. Aspergilloz tanısı galaktomannan antijen pozitifliği, klinik ön tanı ve radyoloji eşliğinde konulmuştur. Kültürde pozitiflik alınamamış olması nedeniyle bütün invaziv aspergilloz tanısı konmuş hastalar "yüksek olası invaziv aspergilloz" grubunda sınıflandırılmıştır. Galaktomannan antijeni pozitif bulunarak, yüksek olası invaziv aspergilloz tanısı almış 10 hastadan dokuzunda PCR ile *Aspergillus* DNA'sı pozitif bulunurken, bir hastada yalancı negatiflik elde edilmiştir. Testin duyarlılığı buna göre hesaplanmıştır. Doku örneklerinde DNA miktarının düşük olması, çoğaltma basamağında testin duyarlılığını düşürmüştür. Deneysel modelden alınan doku örneklerinde yaşanan bu yalancı negatiflik nedeniyle, gerçek hastalardan alınacak doku örneklerinde daha uzun bir DNA eldesi uygulanması, parçalayıcı proteinaz K enzimiyle bir gecelik inkübasyona bırakılması veya EAPCRI çalışmasında olduğu gibi otomatize sistemlerin kullanılması önerilebilir. Klinik örnekteki DNA miktarı PCR testinin başarısıyla doğrudan ilişkilidir. Aspergilloz tanısı için bronkoalveoler lavaj örneklerinin kullanıldığı bir çalışmada beta-globulin miktarı ile PCR testinin duyarlılığı arasında doğru ilişki bulunmuştur. Bu nedenle beta-globulin kullanımının testin negatif prediktif değerini artırabileceği düşünülmüştür^[22].

Pulmoner aspergilloz en sık görülen klinik tablo olduğu için tanı yöntemleri genellikle solunum yolu örnekleri için geliştirilmektedir^[23,24]. Kan örnekleri hem pulmoner aspergilloz hem de diğer invaziv formlarda tanı için kullanılabilen bir örnektir. Bu nedenle çalışmamızda kan ve doku örneklerine yönelik bir çalışma yürütülmüştür.

Yöntemin uygulanma süresi ve maliyeti de değerlendirilmiştir. Maliyet, alt yapısı hazır laboratuvarlar için sadece sarf malzeme alındığında 12 TL olarak hesaplanmıştır. Bu yöntemde gerçek zamanlı bir PCR cihazına gerek vardır. Bu çalışmada anabilim dalımızda kullanılan, tek bir cihaz değerlendirilmiştir. Başka gerçek zamanlı PCR cihazları da *Aspergillus* PCR testi için kullanılmaktadır. Ülkemizde gelişmekte olan bu alanın, başka cihazların, başka yöntemlerin ve protokollerin

karşılaştırıldığı yeni çalışmalarla zenginleştirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışma bir kalite kontrol çalışmasıdır. Bu nedenle sonuçları kalite kontrolü açısından değerlendirilmelidir. *Aspergillus* PCR testi standardizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra, bütün dünyada hasta tanısında kullanılacaktır. Henüz standardize olmadığı halde, bir çok merkezde geliştirilmiş "özgün" protokoller dahilinde rutin tanı için uygulanmaktadır. Ülkemizde sağlık harcamaları ve laboratuvar hizmetlerinin fiyatlandırılması Sosyal Güvenlik Kurumu tarafından Sağlık Uygulama Tebliğine göre düzenlenmektedir. SUT listesinde aspergilloz tanısına yönelik kültür dışı tanı yöntemi olarak galaktomannan antijeni bulunmaktadır. Bu test 2010 yılı SUT listesinde "907.390" kodu ve 38.20 TL fiyat ile listelenmiştir. Haftada en çok iki kere uygulandığı zaman geri ödemesi yapılmaktadır. Henüz SUT içinde yer almayan, *Aspergillus* PCR testinin de bu çerçevede değerlendirilmesi ve SUT listesine dahil edilmesi, immün sistemi baskılanmış hasta grubunda tanı olanaklarını genişletecek ve gereksiz antifungal kullanımının yarattığı maliyet artışını engelleyecektir.

Aspergillozun tanısında galaktomannan testi eşliğinde PCR testinin kullanılmasının yüksek riskli hasta grubunda yararlı sonuçlar verdiği bilinmektedir^[25]. İnvaziv aspergilloz tanısına yönelik olarak geliştirdiğimiz kalitatif gerçek zamanlı PCR yönteminin kan, doku, solunum sistemi örnekleri gibi çok farklı klinik örneklerde kullanılabilir, hızlı ve ucuz bir moleküler tanı yöntemi olduğu, çok merkezli, geniş ölçekli çalışmalar ile desteklenmesi gerektiği ve gelecekte hasta tanısında kullanılabilirliği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Badiee P, Alborzi A. Detection of *Aspergillus* species in bone marrow transplant patients. *J Infect Dev Ctries* 2010;4:511-6.
2. Buchheidt D, Hummel M. *Aspergillus* polymerase chain reaction (PCR) diagnosis. *Med Mycol* 2005;43(Suppl 1):S139-S145.
3. Abdin MZ, Ahmad MM, Javed S. Advances in molecular detection of *Aspergillus*: an uptake. *Arch Microbiol* 2010;192:409-25.
4. Bretagne S. Primary diagnostic approaches of invasive aspergillosis-molecular testing. *Med Mycol* 2011;49(Suppl 1):S48-S53.
5. Asciglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, et al.; Invasive Fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer; Mycoses Study Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002;34:7-14.
6. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al.; European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008;46:1813-21.
7. White PL, Bretagne S, Klingspor L, Melchers WJ, McCulloch E, Schulz B, et al.; European Aspergillus PCR Initiative. *Aspergillus* PCR: one step closer to standardization. *J Clin Microbiol* 2010;48:1231-40.
8. Schulz B, Weber K, Radecke C, Scheer C, Ruhnke M. Effect of different sample volumes on DNA extraction of *Aspergillus fumigatus* from whole blood. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:686-8.
9. Loeffler J, Barnes R, Donnelly JP. Standardization of *Aspergillus* PCR diagnosis. *Bone Marrow Transplant* 2012;47:299-300.
10. Blennow O, Mattsson J. Standardization of *Aspergillus* PCR is needed. *Bone Marrow Transplant* 2011;46:1018.
11. Gomez-Lopez A, Martin-Gomez MT, Martin-Davila P, Lopez-Onrubia P, Gavalda J, Fortun J, et al.; Spanish Research Network of Infection in Transplantation (RESITRA). Detection of fungal DNA by real-time polymerase chain reaction: evaluation of 2 methodologies in experimental pulmonary aspergillosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;56:387-93.
12. Aydoğan S, Kuştımur S, Kalkancı A. İnvazif aspergilloz oluşturulan sıçanlarda glukon ve galaktomannan testleri ile gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu sonuçlarının karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2010;44:441-52.
13. Hizel K, Kokturk N, Kalkancı A, Ozturk C, Kustımur S, Tufan M. Polymerase chain reaction in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycoses* 2004;47:338-42.
14. Schabereiter-Gurtner C, Selitsch B, Rotter ML, Hirschl AM, Willinger B. Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2007;45:906-14.

15. Gürcan Ş, Demir M, Altıay G, Tikveşli M, Kılıç H, Oktun M. *Aspergillus spp.* isolations from respiratory tract samples in Trakya University Hospital. *Tuberk Toraks* 2007;55:160-6.
16. Badiie P, Kordbacheh P, Alborzi A, Ramzi M, Shakiba E. Molecular detection of invasive aspergillosis in hematologic malignancies. *Infection* 2008;36:580-4.
17. Bustin SA. Developments in real-time PCR research and molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2010;10:713-5.
18. Tichopad A, Bar T, Pecen L, Kitchen RR, Kubista M, Pfaffl MW. Quality control for quantitative PCR based on amplification compatibility test. *Methods* 2010;50:308-12.
19. Dhanasekaran S, Doherty TM, Kenneth J; TB Trials Study Group. Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *J Immunol Methods* 2010;354:34-9.
20. Işık N. Mantarlara ait DNA eldesinde iki farklı ekstraksiyon yönteminin karşılaştırılması ve sekans analizlerinin değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2003;33:66-70.
21. Millon L, Grenouillet F, Crouzet J, Larosa F, Loewert S, Bellanger AP, et al. False-positive *Aspergillus* real-time PCR assay due to a nutritional supplement in a bone marrow transplant recipient with GVH disease. *Med Mycol* 2010;48:661-4.
22. Fréalle E, Decrucq K, Botterel F, Bouchindhomme B, Camus D, Dei-Cas E, et al. Diagnosis of invasive aspergillosis using bronchoalveolar lavage in haematology patients: influence of bronchoalveolar lavage human DNA content on real-time PCR performance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28:223-32.
23. Toun FF. A systematic literature review on the diagnosis of invasive aspergillosis using polymerase chain reaction (PCR) from bronchoalveolar lavage clinical samples. *Rev Iberoam Micol* 2007;24:89-94.
24. Khot PD, Ko DL, Hackman RC, Fredricks DN. Development and optimization of quantitative PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *BMC Infect Dis* 2008;8:73.
25. Armenian SH, Nash KA, Kapoor N, Franklin JL, Gaynon PS, Ross LA, et al. Prospective monitoring for invasive aspergillosis using galactomannan and polymerase chain reaction in high risk pediatric patients. *J Pediatr Hematol Oncol* 2009;31:920-6.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Prof. Dr. Ayşe KALKANCI

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Besevler, Ankara-Türkiye

E-posta: kalkanci@gazi.edu.tr